

O NOUA MODIFICARE A METODEI DE IMPREGNARE BIELSCHOWSKY, PENTRU STUDIAREA FIBRELOR NERVOASE ALE DIFERITELOR ORGANE INTERNE *

I. Kelemen

Pentru studierea amănunțită a sistemului nervos periferic și a inervației vegetative a diferitelor organe interne, se cunosc numeroase metode histologice, dintre care cele mai răspândite sînt: colorațiile postvitale (metodele lui Ehrlich, Sabadas, Niculescu etc.) și metodele de impregnare argentică (metodele lui Cajal, De Castro, Bielschowsky, Gross, Schultze, Boeke, Traițki, Laurentiew).

Metoda de impregnare cea mai răspîdită astăzi, aceea a lui Bielschowsky—Gross, da rezultate bune, însă numai dacă e utilizată de neurohistologi cu experiența intrucit o mică greșeală intervenită în cursul impregnării (schimbarea pH-ului apei distilate, impuritatea chimică a soluției de argint, de amoniac, sau a hidroxidului de sodiu) poate compromite succesul impregnării. Deseori scăderea concentrației soluției de nitrat de argint duce la impregnarea țesutului conjunctiv, în special a fibrelor reticulare, fapt care îngreunează interpretarea tabloului neurohistologic obținut. Așa se explică de ce mulți neurohistologi au modificat deseori această metodă originală în funcție de proprietățile histologice ale organului studiat.

Lucrări recente (1, 2, 4) care studiază chimia impregnărilor argentice, arată că tabloul neurohistologic al organelor care au stat timp mai îndelungat în formol este mai clar decît al acelor care au fost fixate timp scurt. Această observație se explică prin împrejurarea că în cursul unei fixări îndelungate, în formol se produce acid formic, care duce la scăderea pH-ului fixatorului, favorizînd impregnările metalice.

Pornind de la aceste considerații și folosind datele propriei noastre experiențe am reușit să introducem cîteva modificări, care înlesnesc cercetarea neurohistologică a diferitelor organe interne, în special a organelor așa-zise compacte, ca rinii, Tg-Mureș.

chiul, ficatul, amigdalele etc. Impregnarea a devenit mai sigură, s-a redus timpul fixării, iar aplicarea hidrogenului hiperoxidat ca mordansator înlătură folosirea piridinei care este cancerigenă și are un miros urît, pătrunzător.

Descriem în cele ce urmează metoda pe care o aplicăm cu succes de mai multe luni la studiul inervației normale și patologice a diferitelor organe interne.

1. *Fixarea* se face într-un fixator supraacidulat care se compune din:

— formol neutru conc.	4 părți:
— alcool 96%	2 ..
— apă distilată	3 ..
— acid acetic glacial	1/50 ..
— acid azotic conc. pur	1/1000 ..

Soluția fixatoare trebuie preparată astfel încît pH-ul ei să se mențină între 2,5—4,5. Pieșele obținute prin autopsii sau biopsii (de 4—5 mm grosime și 4×3 cm suprafață) se fixează în această soluție, timp de 15—20 de zile. Dacă nu avem timp

* Lucrare prezentată la ședință din 11 dec. 1962, a Societății de Mornologie, Filiala



Fig. nr. 1: Rinichi uman; fibre nervoase de-a lungul unei arteriole pornind către canaliculii renali. Mărire: $45/0,65 \times 6$ ROW. Metodă de impregnare modificată.



Fig. nr. 2: Rinichi uman; fibre nervoase ce trec prin parenchimul renal. Mărire: $24/0,42 \times 6$ ROW. Metodă de impregnare modificată.



Fig. nr. 3: Rinichi uman; fibre nervoase în jurul canaliculilor renali. Mărire $45/0,55 \times 10$ ROW. Metodă de impregnare modificată.

să le prelucrăm, pot să rămână și pe mai de parte în fixator, fără să se altereze. apoi este însă necesară o spălare mai îndelungată (24 ore) în apă curgătoare. Dacă avem de prelucrat piese de mai mult timp fixate în formol sau în alte soluții fixatoare, procedăm la refixarea lor timp de 24 ore în soluția următoare, după o spălare prealabilă de 12 ore în apă distilată:

formol neutru conc.	2 părți
— alcool 96%	3 părți
— apă distilată	1 parte
— acid azotic conc. pur	5 picături, la 100 ml soluție.

2. *Spălarea*, atît a materialului proaspăt, cît și a celui vechi se face cu apă de robinet curgătoare, pentru a îndepărta impuritățile depozitate, de pe suprafața organului, pe urmă în baie de apă distilată, schimbată de mai multe ori, timp de $\frac{1}{2}$ oră.

3. *Secționarea* se execută cu microtom de congelare. Secțiunile de 15—30 microni grosime se pun în apă distilată, unde rămîn cel puțin 10 minute.

4. *Mordansarea* se face într-o soluție 5% de hidrogen hiperoxidat timp de 30—60 de minute, după care secțiunile se spală în apă distilată, schimbată de mai multe ori.

5. *Impregnarea* se face într-o baie de argint 30—40%, în termostat la 56° C timp de 30 minute — 2 ore, pînă cînd secțiunile capătă o culoare brună gălbuie. La studiul neurohistologic al rinichiului, ficatului, pielii, țesutului muscular și al limbii, cele mai bune rezultate le-am obținut după 40—50 de minute.

6. *Revelarea* secțiunilor impregnate se face după cum urmează:

Soluția A. Este o soluție argento-amoniacală, preparată altfel decît la metoda originală Bielschowsky—Gross și anume în așa fel încît să se obțină un pH constant.

La 10 ml soluție azotat de argint de 30—40% se adaugă 10 picături de NaOH 40%. Precipitatul format, îl dizolvăm cu soluție de hidroxid de amoniu 28%. După dizolvarea precipitatului brun, mai adăugăm cîteva picături dintr-o soluție de azotat de argint 10%, pînă ce soluția devine opalescentă. Pe urmă o dizolvăm cu apă distilată în proporție de 1:4.

Soluția B. E o soluție de reducere, aplicată în tehnica neurohistologică prima dată de Szentpétery (3). Ea conține:

- zaharoză 8 g.
- acid azotic conc. 0,3 g.
- alcool 96% 35 g.
- apă distilată la 100 ml, la care am adăugat 1 ml. formol neutru concentrat.

Soluția se păstrează la întuneric și în sticlă bine închisă, putînd fi întrebunțată mai mult timp. Din soluția A se iau 10 ml, adăugîndu-li-se 5 picături din sol. B. Secțiunile impregnate în baie de argint, după o clătire rapidă în apă distilată (3) se așează în această soluție de relevare pînă ce capătă o culoare brună-gălbuie.

7. După relevare, secțiunile se trec 3 minute în apă amoniacală (amoniac conc. 5 ml se dizolvă în 50 ml. de apă distilată) pe urmă se clătesc în trei băi de apă acidulată (la 50 ml. apă distilată se pun 10 pic. acid glacial); secțiunile se pun în apă distilată pentru spălare timp de 1—2 ore. Această soluție supraacidulată oprește reducerea și favorizează virarea în clorură de aur.

8. *Virarea în soluție de clorură de aur acidulată* se face timp de 10 minute, pînă cînd culoarea brună-gălbuie a secțiunilor se schimbă spre cenușiu-violet. *Prepararea soluției de clorură de aur:* la 10 ml de apă distilată se adaugă 10 pic. sol 1% de clorură de aur (aurum chloratum fuscum!) și 5 picături de acid acetic glacial. După 15—20 secțiuni soluția se schimbă!!!

9. *Spălarea rapidă în apă distilată* se face 1 minut.

10. Fixarea împregnării în sol. alcoolizată de tiosulfat de sodiu 10%, timp de $\frac{1}{2}$ —1 minut. Soluția fixatoare se prepară astfel: la 90 ml de sol. de tiosulfat de sodiu 10% se adaugă 10 ml alcool 96%. Această doză este suficientă pentru fixarea a 100 de secțiuni.

11. *Spălarea în apă distilată* se face 1—2 ore.

12. Secțiunile bine spălate se trag cu ajutorul unei mici baghete de sticlă pe o lamă de microscop; picurându-le soluțiile se trec apoi prin următoarele băi de alcool 60%, alcool 96%, alcool absolut, alcool abs. și alcool amilic în amestec egal, carbol-xilol, xilol, xilol, pe urmă închidere în balsam.

Rezultate. Dacă secțiunile nu trec prin baia de aur, pe un fond mai decolorat de culoare gălbuie fibrele și terminațiunile nervoase se văd în negru. După aurire, fondul apare în culoare roșie violacee.

Metoda poate fi aplicată în orice laborator histopatologic.

Sosit la redacție: 18 decembrie 1962.

Bibliografie

1. ABRAHAM A.: Ann. Biol. Univ. Hung., Budapest (1951), T. 1, 325—340; 2. FERNANDEZ J.: Archivos de neuro-psiquiatria (1958), 16, 1, 29—40; 3. SZENTPÉTERY J.: Medicina Internă, București (1954), 1, 140; 4. WOLMAN M.: Laboratory Investigation (1957), 6, 6, 551—557.